

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-226900

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)11月12日

C 07 K 15/18
A 61 K 39/00
G 01 N 33/531

6464-4H
7043-4C
7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 3 (全10頁)

⑮ 発明の名称 核酸-タンパク質複合体

⑯ 特 願 昭60-46684

⑰ 出 願 昭60(1985)3月11日

優先権主張 ⑱ 1984年3月12日 ⑲ 米国(US) ⑳ 588858

㉑ 発 明 者 ナニブフシヤン・ダツ アメリカ合衆国コネチカット州06511ニューヘブン・アバ
タグブタ ートメント79・プロスペクトストリート 470

㉒ 発 明 者 ウィリアム・ノウルズ アメリカ合衆国コネチカット州06518ハムデン・スリーピ
ングジャイアントドライブ 101

㉓ 出 願 人 モレキュラー・ダイア アメリカ合衆国コネチカット州06516ウエストヘブン・モ
グノステイツクス・イ ーガンレイン 400
ンコーポレーテッド

㉔ 代 理 人 弁理士 小田島 平吉
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

核酸-タンパク質複合体

2. 特許請求の範囲

1. 核酸の1端に共有結合されたタンパク質。

2. 核酸が一本鎖または二本鎖であり、そして前記核酸がデオキシリボ核酸またはリボ核酸またはオリゴデオキシリボヌクレオチドまたはオリゴリボヌクレオチドまたはそれらの雑種であることを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の結合タンパク質。

3. 核酸がH_g、SHまたはNH₂の官能基を有することを特徴とする特許請求の範囲第1または2項記載の結合タンパク質。

4. タンパク質が、

a) 他のタンパク質、

b) 核酸の特異的ヌクレオチド配列、

c) ハプテン、または

d) 配位子、

に対する親和性を有することを特徴とする特許請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の結合タンパク質。

5. 核酸が少なくとも1つの物理的または化学的に検出可能な標識を支持することを特徴とする特許請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の結合タンパク質。

6. 標識が発蛍光団、染料、抗原、配位子、酵素、酵素の基質、コファクター、放射性同位元素、炭水化物またはそれらの組み合わせであることができることを特徴とする特許請求の範囲第1～5項のいずれかに記載の結合タンパク質。

7. 特異的に結合性の化合物を標識付けされた核酸の1端に結合させることを特徴とする分析物(analyte)を特異的に結合性の化合物と複合化させることからなる分析物の決定方法。

8. 特異的に結合性の化合物が、

a) 他のタンパク質、

- b) 核酸の特異的ヌクレオチド配列、
- c) ハプテン、または
- d) 配位子、

に対する親和性を有するタンパク質であることを特徴とする特許請求の範囲第7項記載の分析物の定量方法。

9、核酸を化学的処理または酵素的処理に付してタンパク質を結合することのできる官能基を1端に導入することをことを特徴とする核酸の1端に共有結合されているタンパク質の調製方法。

10、核酸は1端にリボース部分を支持し、前記リボース部分を酸化して側鎖のアルデヒド基を形成し、前記アルデヒド基は Schiff 塩基を介してタンパク質を結合することができ、そして必要に応じて、前記アルデヒド基を還元することをことを特徴とする核酸の1端に共有結合されているタンパク質の調製方法。

11、核酸を少なくとも1つの物理的または化学的に検出可能な標識で標識付けすることを特徴

とする特許請求の範囲第9または10項のいずれかに記載の核酸の1端に共有結合されているタンパク質の調製方法。

3、発明の詳細な説明

本発明は、タンパク質を標識付けされた核酸と共有結合することによるタンパク質の標識付けおよび診断を目的とする免疫検定におけるこれらの標識付けされた物質の使用に関する。

免疫学的試薬、例えば、抗体は、抗原として知られている異質物質の導入に应答して体により生産されるタンパク質分子である。特異的抗体は特異的抗原へ結合して、抗原-抗体複合体を生成する。抗体はその相補的抗原のみに結合するので、抗体を使用して種々の生物学的試料中の特異的抗原の存在を検出することができる。ある種の病気の状態の検出および診断のこのような免疫学的方法は、生物医学に大変革を起こした。抗体は血液、尿、および他の体液の中の少量の特別の分子（例えば、タンパク質、ホルモン、薬物）の

存在を測定するために現在普通に使用されている。

抗原とその対応する抗体との間の特異的相互作用を検出するために通常使用される1つの方法は、インシュリンの検出について Yalow および Berson により発見された放射線免疫検出応法 (RIA) である。(アール・エス・ヤロウ および エス・エイ・パーソン (R. S. Yalow および S. A. Berson); J. Clin. Invest. 1960: 39: 1157-1175)。RIA は検定される抗原がまず放射性同位元素で標識付けされ、次いで放射性同位元素を計数する標準の手段により定量されるという事実に頼る。各種類の放射性標識付けは、制限、例えば、検出の感度、同位元素の半減期、オペレーターへの危険および廃棄物処理の問題を有する。放射性同位元素を計数するために必要な費用もかなりの額になる。したがって、放射能に頼らないで免疫標識付けを達成すること

が高度に望ましい。

いく種類かの非放射性免疫検定法が実際に存在するが、その感度の水準は RIA により到達するものに匹敵していない。

検定の1つのタイプ、例えば、抗原を化学的に蛍光性化合物で処理し、これにより蛍光標識付け抗体の位置を特別の蛍光顕微鏡で同定できるようにすることによって実施される。蛍光標識付け抗体の使用は多くの用途をもつ広く用いられている手順であるが、この技術もある制限をもち、なかでも現存する方法により標識付けされた抗体は少量の抗原性物質を検出するために十分な感度をもたないという制限をもつ。感度を増加するために、ポリリジンが発蛍光団を結合するために使用されてきているが、ポリリジンは多くのタイプの化合物に非特異的に結合するので、高いバックグラウンド (background) の問題が生ずる。

標識試薬の他のタイプは、タンパク質-バクテ

リオファージ複合体、安定な遊離基、電子密な (electron dense) 化合物、発光性化合物および酵素を包含する。これらの標識試薬のすべては、ある種の欠点を有する。ある種の試薬、例えば、酵素は貯蔵が困難である。ある種の標識試薬は、マルチタイプのコピー (multitype copy) が存在しないかぎり、十分に感受性ではない。標識のマルチタイプのコピーが反応成分に直接結合する場合、蛍光性標識の場合におけるように、抗体は抗原へ結合する能力を失うことがあり、すなわち、特異性に劣るようになることがある。[エイ・エイチ・グブリュ・エム・シユールスおよびビー・ケー・バン・ウィーメン (A. H. W. M. Schuurs & B. K. Van Weemen), *clin. chim. Acta* 81, (1977) 1-40; デイ・エス・スミスら (D. S. Smith et al.), *Ann. Clin. Biochem.* 18 (1981) 2

AもしくはRNAまたはそれらの断片であることができる。標識は既知の方法で検定できるいかなるもの、例えば、ハプテン例えばビオチン、酵素例えばβ-ガラクトシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、セイヨウワサビのペルオキシダーゼ、パバインまたはフィコビリタンパク質であることもできる。

したがって、本発明の目的は非放射性である高度に便利かつ感受性の免疫検定を提供することである。

本発明の他の目的は、多数の標識、すなわち、20/タンパク質以上の標識で免疫学的試薬を標識付けし、高度の感受性の、例えば、放射線免疫検定と同程度に感受性の免疫検定を与える手段を提供することである。

本発明の他の目的は、免疫学的反応の妨害が存在しないような方法で免疫学的試薬を標識付けすることである。

これらの目的および他の目的および利点は、本

53-274参照]。したがって、免疫学的試薬を直接標識付けして、このような特異性の低下を回避することが高度に望ましい。

欧州特許出願第84 107 624.3号は核酸を標識付けする光化学的方法を開示している。この発明は、好ましくは交差検定において検出の目的に用いられ、免疫学的検定において使用することができる。標識付けは光反応性フロクマリンまたはフェナントリジウム化合物を使用して核酸を標識に結合する。この標識は慣用法により検定することができる。こうして、最終生成物は、(a) 核酸成分、(b) 核酸成分へ結合したフロクマリンまたはフェナントリジウム化合物および(c) (b)へ化学的に結合した標識からなる標識付け核酸プローブからなる。DNAへの結合には、アミノメチルトリオキサレン、アミノメチルアングリシンおよびアミノアルキルエチジウムもしくはメチジウムアジド類が好ましい結合試薬である。核酸成分は一本鎖もしくは二本鎖DN

発明に従い実現される。本発明によれば、核酸の1端へ共有結合したタンパク質が提供される。核酸は標識の担体である。ポリヌクレオチド類は共有結合的に修飾 (covalently modify) されて多数の蛍光性分子および免疫原分子を支持することができるので、それらは多数標識 (multiple labeling) のためのマトリックスとしてはたらく。核酸分子は、例えば、蛍光性分子またはハプテンで高度に標識される。次いで、標識付けされた核酸は、タンパク質、例えば、タンパク質Aに共有結合される。

共有結合されたタンパク質-核酸は、多数の標識を、核酸上に、有利には共有結合の前にかつ結合された物質を免疫検定に使用する前に、支持することができる。

標識は、いかなる既知のタイプであることもでき、例えば、発光団、抗原、ハプテン、酵素、放射性同位元素、コファクターまたは炭水化物で

あることができる。

使用において、結合された物質のタンパク質部分は、ある他の試薬、例えば、他のタンパク質、核酸の特異的ヌクレオチド配列、例えば、リブレッサータンパク質またはハプテンに対して特異性であり、後者は抗ハプテン抗体と二次反応により検出可能である。この特異性により、実際に、標識はタンパク質が特異的に結合する部位へ「取り付けられる (attached)」ようになる。

本発明は、また、標識の存在により決定されるような、抗原についての検定を実施する方法に拡張され、ここで抗原は、試料中に含有される場合、抗体と複合化される。次いで、抗原-抗体複合体は、抗体と標識付けされたタンパク質との間の結合により、標識付けされたタンパク質へ結合される。この免疫検定は、タンパク質の1端へ共有結合された核酸が検定により検出されるべき標識を支持するということにおいて、先行免疫検定

より改良されている。

本発明は、また、放射線免疫検定手順に拡張され、ここで試料中に存在しうる抗原は前記抗原に対して特異性の抗体と複合化され、この複合体は、前述のように、共有結合されたタンパク質-核酸へ結合され、その後核酸部分は放射能的に標識付けされ、そして標識は検定される。

本発明の詳述するにあたって、タンパク質成分は、それが部位特異性であるかぎり、多数の種類のものであることができる。特に適当な物質は、イムノグロブリン類、タンパク質Aなどを包含する。タンパク質Aは、スタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*) から分離される40,000ダルトンの一本鎖ポリペプチドである。*S. aureus* のある株において、それは細胞壁のペプチドグリカン部分へ共有結合されている。タンパク質Aはいく種類かのIgG部類の抗体へFc-結合区域により結合する。この場合において、抗体は試験

試料中の検出すべき抗体に対して特異性である。タンパク質Aは熱および変性剤に対して非常に安定であり、そして変性状態に引き続いて復元することができる。[ジェイ・ダブリュー・ゴードینگ (J. W. Goding): 「免疫学的試薬におけるスタフィロコッカス・タンパク質Aの使用」 (Use of Staphylococcal Protein A as an immunological reagent), J. Imm. Methods 20 241-253 (1978) 参照]。タンパク質AのIgGへの結合は、IgG分子の抗原部位へ影響を及ぼさない。

あるいは、タンパク質部分はIgGのような抗体であることができ、こうして試験試料中のある抗原に対して特異性であろう。抗原は可溶性であり、細胞表面または粒状物質へ固有にあるいは化学的に結合されうる。一般に、すべての抗原はNAPA試薬の使用により検出されうる。

未知の試料中で検出されうる診断の抗原は、リンパ球遺伝標識、腫瘍特異性抗原、腫瘍細胞、膜受容体、微生物抗原、血液型および組織適合性の型を代表する抗原、および血清、尿などの中の抗原を包含し、それらは種々の病気の状態において上昇したりあるいは低下する。

抗体は特定の抗原に対する特異性を有する。抗体はモノクロナルまたはポリクロナルのいずれかであることができ、そして1種または2種以上のタイプ、IgG、IgMなどであることができる。抗原は生体内である数の種により、あるいは生体外で細胞培養または組み換えDNA技術により生産されることができる。

核酸は一本鎖または二本鎖のDNA、RNA、DNA-RNA雑種、オリゴリボヌクレオチドまたはオリゴデオキシリボヌクレオチドであることができる。

タンパク質は核酸へ種々の方法で共有結合させることができる。1つの手順において、核酸の1

端を、例えば、末端トランスフェラーゼで修飾して、すでに存在しない場合、リボヌクレオチド末端を確立する。リボヌクレオチド末端は過ヨウ素酸塩で酸化してアルデヒド基を形成し、このアルデヒド基は Schiff 塩基の反応をタンパク質のアミノ基と行い、次いで水素化により安定なアミノメチル結合をタンパク質と核酸との間に形成する。

標識は、タンパク質への結合の前後に、そして検定の非常に後の段階においてさえ、核酸部分へ適用することができる。標識は核酸上に存在するため、タンパク質との反応を妨害せず、1つのタンパク質部分につき多数の標識、例えば、20～100以上の標識が存在することとさえできる。ある種のタンパク質が直接標識付けされる場合、6程度に少ない標識は反応を妨害するために十分であることが、以前に示された。

標識は欧州特許出願第84 107 624、3号中に詳述されているようにして核酸へ取り付

けることができる。代表的な標識は、蛍光団類、例えば、フルオレセイン、テキサス・レッド (Texas red)、ローダミンまたはフィコエリスリン (phycoerythrine)；二次標識付け抗体のための標的としてはたらくことができるハプテンまたは抗原；標識付けされたアビジンまたは抗ビオチンにより検出することができるビオチン；慣用法で検定される酵素、例えば、セイヨウワサビのペルオキシダーゼまたはβ-ガラクトシダーゼ；発光検定のためのコファクター、例えば、FADまたはβ-ガラクトシダーゼ；エネルギー伝達またはクエンチング (quenching) を行う蛍光修飾試薬；放射性同位元素；または炭水化物を包含する。

前述のように、タンパク質部分は、例えば、IgGのような抗体のFc部分に対して、部位特異性であるべきである。

NAPA複合体の標識が発光団である場合、IgG-NAPA複合体と反応する抗原の存在は

直接の蛍光免疫検定により決定することができる。標識がハプテンである場合、二次増幅 (secondary amplification) が必要であり、ここでそのハプテンに対して特異性であるIgG分子を使用する。標識が酵素である場合、結合した酵素の量を既知の方法でその基質の酵素触媒反応により決定できる酵素の検定を使用することができる。標識が放射性同位元素である場合、放射線免疫検定を慣用法で実施する。一次NAPA複合体の標識に対して特異性であるIgGとの二次増幅の場合において、異なる標識を支持する第2標識付けNAPA複合体の添加により読み出し (read-out) を達成することができる。

共有結合したタンパク質-核酸は免疫検定において慣用法で使用するができ、標識は最初に存在するか、あるいは最終の検定より前のいかなる段階においても添加することができる。

本発明を添付図面を参照しながらさらに説明す

る。

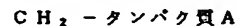
図面、とくに第1図を参照すると、末端リボス残基 (NAr) を含有する核酸を、核酸を結合する配位子へ光化学的方法 (hp) により結合する。NArがDNAである場合、NArはTdT-ATP (末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ-アデノシントリホスフェート) から調製する。NArがRNAである場合、それはそのまま使用する。共有結合の付加物 (covalent adduct)、(NAr) 配位子、が生成する。光化学的方法は、例えば、欧州特許出願第84 107 624、3号中に記載される光反応性エチジウムアジドまたはプソラレン (psoralen) 誘導体を使用する。アミノメチルプソラレン例えば、アミノメチルトリオキサレン (trioxsalen) (AMT) またはアミノメチルジメチル-アングリシン (AMA) を使用する場合、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) による二次標識付けが可

能である。付加物、例えば、(NAr) 配位子-標識、が生成し、これを過ヨウ素酸塩 (NaIO₄) で酸化することによりアルデヒド基



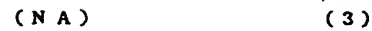
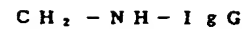
配位子-標識

を形成する。この複合体(1)はタンパク質Aと反応し、そして(2)においてNaBH₄で還元されて、NAPA複合体



配位子-標識

タンパク質Aの代わりに、複合体(1)がIgGと反応し、そして(2)において還元されると、NA-IgG



配位子-標識

が生成する。

フルオレセインの代わりに、他の標識、例えば、ハプテン、酵素、コファクター、抗原、放射性同位元素、炭水化物および他の発蛍光団を同様に使用することができる。

より詳しく第2図を参照すると、いくつかの物理的あるいは化学的に検出可能な標識を支持する核酸の端へタンパク質Aを共有結合させる。直接蛍光測定を望む場合、標識(本)は発蛍光団であることができる。免疫検定に基づく酵素の調製のために、標識は酵素または酵素の基質であることができる。酵素、セイヨウワサビのペルオキシダーゼの結合に関すると、この酵素の約10~100のコピーを結合させることができる。放射性

測定を望む場合、核酸を適当な放射性同位元素で標識する。核酸は一本鎖または二本鎖のDNA、RNA、DNA-RNA雑種、オリゴヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドであることができる。

標識付けされたタンパク質A付加物(NAPA)はIgGまたはIgG-抗原複合体と反応するであろう。次いで、この複合体を慣用法で検定することができる。

さらに増幅を望むとき、ハプテンまたは適当な抗原を標識として使用する。次いで、前記複合体を標識に対して特異性の抗体と反応させ、追加量のNAPA(試薬I)と自由に結合する抗体のFc断片を残す。次いで、これを前のように検定することができる。

次の実施例により本発明をさらに説明する。これらの実施例において、特記しないかぎり、すべての部は重量による。

実施例1

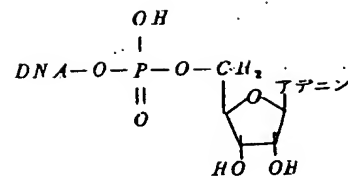
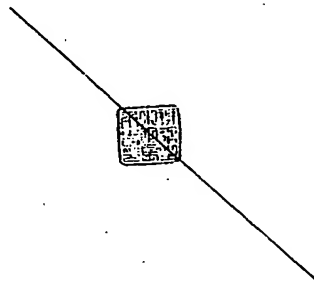
DNAの端においてリボース残基を結合する末端トランスフェラーゼ反応

QX174RFのHae III消化物または実施例3の生成物をカリウムコジレート緩衝液(pH 7.2; 200ミリモル)に対して透析し、そして濃度を10⁻⁴モルに塩基対において調節する。このDNA溶液(100μl)に、5μlの2ミリモルのジチオスレイトール、1⁻⁴C標識ATPと混合した1μlの10ミリモルのATPおよび10μlの10ミリモルの塩化コバルトを添加する。この混合物を37℃において5分間インキュベーションし、次いで水中で10分間冷却する。15単位の末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを添加し、そしてこの混合物を15℃において60分間インキュベーションする。反応後、酵素をフェノール抽出により除去し、そして未反応のヌクレオチド類を透析またはセファデックス(Sephadex G-50)カラムの通過により除去する。収率を吸収対CPM比か

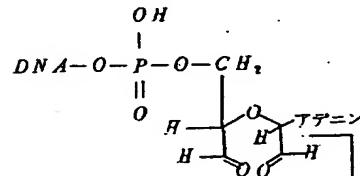
ら計算する。均一な反応を仮定すると、収率はDNAの3'末端につき約10~20ATPである。(RNA-DNA雑種または二本鎖RNAについて、TdTの反応のこの工程はそれ以上の反応について不必要である。)

実施例2

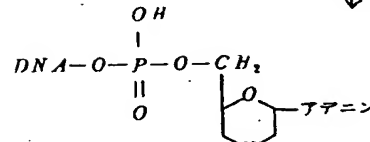
タンパク質の酸化および結合



0.1モルの酢酸ナトリウム pH 5 ;
0.1容量の1モルの過ヨウ素酸ナトリウム



- 1) 0.05モルの酢酸ナトリウム pH 9、1モルのNaCl
- 2) タンパク質またはIgG
- 3) ホウ水素化物の還元



タンパク質またはIgG

実施例1の生成物のリボース末端の酸化を、過ヨウ素酸ナトリウムで室温において0.1モルの酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5 および0.1容量の1モルの過ヨウ素酸ナトリウムを使用して実施する。得られる溶液を1モルのNaCl、0.005モルの酢酸ナトリウム pH 9 に対して透析して過剰の過ヨウ素酸塩を除去する。次いで、タンパク質AまたはIgGを添加し、そしてこの溶液をNa-ホウ水素化物により還元する。

この反応は0~50℃において1モルまでのイオン強度のNaCl中で実施することができる。

実施例3

二本鎖の核酸とアミノメチルトリオキサレンとの間の共有結合

実施例1に記載するように処理したQX174 RF二本鎖DNAのHaeIII制限酵素消化物または実施例2の生成物を、トリス(Tris)-EDTA緩衝液(TE)(10ミリモルのトリスと

ドロキメチルアミノメタン、1ミリモルのEDTA; HClでpH 7.1に調整されたもの)中に溶解するか、あるいはそれに対して透析する。濃度を塩基対において 1.5×10^{-4} モル/lに調整する。TE中に溶解した4'-アミノメチルトリオキサレン(AMT)を添加して、配位子対塩基対の比を0.1にする。この混合物を窒素ガスで15秒間フラッシュし、そして360nmの放射線で60分間照射する。これによりトリオキサレン残基はDNAへ共有結合する。反応後、この混合物に酢酸ナトリウムを添加してイオン強度を上昇させた後、この混合物をエタノールで沈殿させる。この沈殿は、また、上澄み液中に未反応のトリオキサレンを残す。トリチウム化(tritiated)トリオキサレンを使用することにより、結合の相対量を推定することができる。(精確に同一の条件を二本鎖RNAおよびRNA-DNA雑種について使用することができる)。

実施例4実施例2および3の生成物の標識付け

実施例2および3の生成物は、AMTおよび／またはタンパク質からの遊離第一NH₂残基を有する。それらをビオチンおよび／またはフルオレセインまたはローダミンと反応させる。フルオレセインイソチオシアネート(FITC)溶液を、5gの固体を2mlのエタノール中に溶解することにより調製する。実施例2および3の生成物を、0.1モルの重炭酸ナトリウム緩衝液(pH 8~9)に対して透析するか、あるいはその中に溶解させる。次いで、それらをFITCのエタノール溶液と等しい重量濃度で15:1の容量比で混合する。反応を1時間進行させる。生成物をセファデックスG50カラムで精製する。排除された分画は生成物を含有する。ビオチンによる標識付けは、欧州特許出願第84 107 6 2 4.3号中に記載されるように、N-ヒドロキシスクシンイミノビオチンを使用することにより実

施する。

実施例5

ポリアリルアミノウリジンホスフェート(アリルアミノウリジントリホスフェートを慣用法により酵素重合させることにより製造した)を、実施例5におけるように、フルオレセイン、ローダミンまたはビオチンと反応させ、次いで実施例2におけるようにタンパク質と反応させる。

反応の順序を変更させることができ、例えば、DNAをまずAMTと反応させ、次いでリボース残基をTdTにより付加させ、すべてのAMTアミン残基を標識と反応させ、次いでタンパク質とのレドックス反応を介する結合を実施することができる。

実施例6腫瘍-特異性抗原-卵がん抗原(CEA)の検出

CEAは糖タンパク質であり、そして血清CEAの定量は卵巣、乳房および結腸の癌をもつ患者

において予後の診断および潜在的診断の値を有することが示された。

血清の試料(0.1~1ml)を支持物質(例えば、ニトロセルロース)中でインキュベーションして、CEAをこのような支持物質へ結合させる。この結合は非特異性であることができ、例えば、タンパク質のプラスチックへの吸着であることができ、あるいは特異性であることができ、CEAに対して特異性の抗体またはFab断片を使用する支持体へのCEAの固定化であることができ、前記の抗体または断片はこの支持体上に前もって固定化されている。

次いで、固定化されたCEAをポリクロナル抗体(その抗原の特異性およびタンパク質Aの結合特性について選択され、そして抗原への最大の特異的結合を与えるように滴定されている)とともに室温において30分間インキュベーションする。0.05%のツイーン(Tween)-20(PBS-Tw)を含有するリン酸塩緩衝塩溶液

(20ミリモルのリン酸ナトリウム、130ミリモルのNaCl)中で3回洗浄することにより、結合しないタンパク質を除去する。

フルオレセイン標識DNA-タンパク質A複合体を、前記抗体-抗原複合体とともに30分間室温においてインキュベーションし、そしてPBS-Twで3回洗浄して、結合しないNAPA複合体を除去する。

次いで、標識を蛍光顕微鏡検査により検定する。

実施例7組織適合性型の分析

フィコルのハイパーク勾配(Ficoll hypaque gradient)を使用して、全血(1ml)からリンパ球を分離する。リンパ球を1組(battery)の抗血清中でインキュベーションする。前記の抗血清は特定の組織適合性(HLA)のサブタイプ(sub-type)について特異性である。結合しない抗血清

を分画遠心により除去し、そして細胞をPBSで3回洗浄する。洗浄したリンパ球を蛍光標識タンパク質A-DNA複合体とともにインキュベーションする。結合しない蛍光標識タンパク質A-DNA複合体を分画遠心により除去する。次いで、リンパ球を蛍光顕微鏡検査により分析する。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、タンパク質AまたはIgGを核酸へ本発明の1実施態様に従い結合する方法の戦略フローシートである。

第2図は、ある検定において第1図の結合された生成物を使用する方法の戦略フローシートである。

特許出願人 モレキュラー・ダイアグノスティクス・インコーポレーテッド

代理人 弁理士 小田島 平 吉

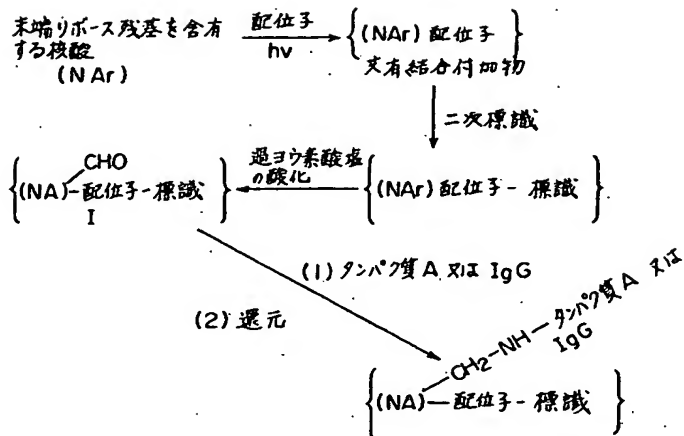


FIG. 1

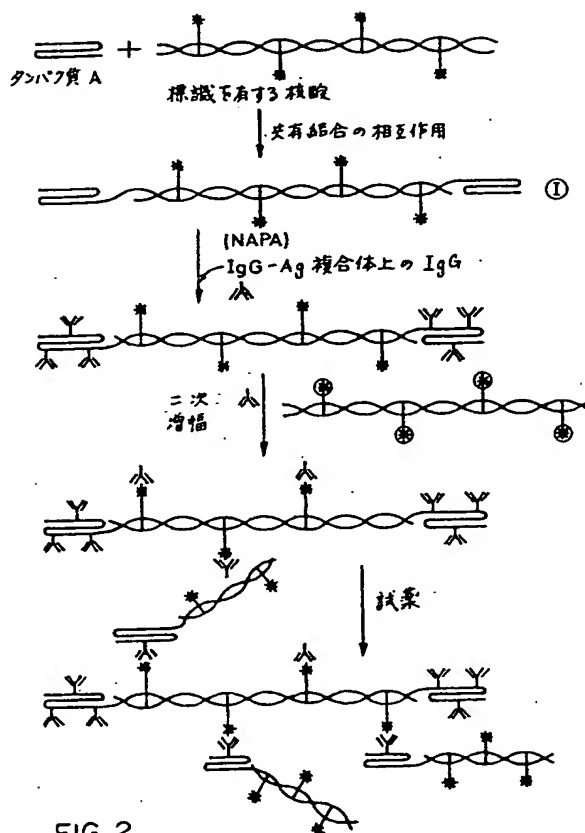


FIG. 2

第1頁の続き

⑦発明者	ビンセント・マーチエ シ	アメリカ合衆国コネチカット州06437セイチエムズヘッ ド・プロスペクトアベニュー 179
⑧発明者	ドナルド・エム・クロ ザーズ	アメリカ合衆国コネチカット州06472ノースフォード・サ レイドライブ(番地なし)